

DELPHION

No active tr:


Select CR**RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION****Log Out** **Work Files** **Saved Searches**

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Der

The Delphion Integrated ViewGet Now:  [PDF](#) | [File History](#) | [Other choices](#)

Tools: Add to Work File: Create new Work

View: [Expand Details](#) | [INPADOC](#) | Jump to: Top Go to: [Derwent](#) [Email](#)

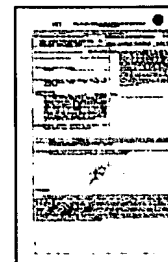
🔍 Title: **WO0007982A1: SATURATED AND UNSATURATED ABIETANE DERIVATIVES, DERIVED CONJUGATES AND USES IN A DIAGNOSTIC COMPOSITION, REAGENT AND A DEVICE**[\[French\]](#)

🔍 Derwent Title: Saturated and unsaturated derivatives of abietic acid and their conjugated derivatives with natural and synthetic polymers, having use in diagnostics, chemical reactions and analysis [\[Derwent Record\]](#)

🔍 Country: **WO** World Intellectual Property Organization (WIPO)

🔍 Kind: **A1** Publ. of the Int. Appl. with Int. search report ⁱ

🔍 Inventor: **CHARLES, Marie-Hélène**; La Lamberte, Chemin du Vernon, F-69420 Condrieu, France
PIGA, Nadia; 2, place d'Helvétie, F-69130 Ecully, France
BATTAIL-POIROT, Nicole; 6, quai Jules-Courmont, F-69002 Lyon, France
VERON, Laurent; 5, rue des Granges, F-69005 Lyon, France
DELAIR, Thierry; Le Coin, F-69700 Echalas, France
MANDRAND, Bernard; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France



🔍 Assignee: **BIO MERIEUX**, Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile, France

🔍 Corporate Tree data: Biomerieux SA ([BIOMERIEUX](#));
[News](#), [Profiles](#), [Stocks](#) and [More about this company](#)

🔍 Published / Filed: **2000-02-17 / 1999-07-27**

🔍 Application Number: **WO1999FR0001846**

🔍 IPC Code: Advanced: [A61K 47/48](#); [C07K 5/06](#); [G01N 33/53](#);
Core: [C07K 5/00](#); more...
IPC-7: [C07C 243/36](#); [C07D 207/46](#); [C07K 5/06](#); [C12Q 1/68](#);
[G01N 33/53](#); [G01N 33/58](#);

🔍 ECLA Code: **A61K47/48T4B18**; C07K5/06A1A; G01N33/53F;

🔍 Priority Number: 1998-07-31 **FR1998000010084**

🔍 Abstract: The invention concerns a saturated or unsaturated abietane derivative of general formula (I) wherein: Z is selected among -COOR⁵, -CONR¹R², -COONR³R⁴, -COR⁶, -CON, -COOR⁵, -CHOHR⁷, -SR⁸, -OR⁸, -CN, -CNO, -CNS, -NCO, -NCS, -R¹R²CR⁹; wherein R¹, R², R³ and R⁴ represent a hydrogen atom, a C1-C10 alkyl, a C6-C20 aryl optionally substituted; a C7-C10 alkene; a C1-C10 alkyne; an aminoacyl or peptidyl optionally substituted; or R¹ and R² or R³ and R⁴ together can form a cycle or a heterocycle; R⁵ represents a hydrogen, a C1-C10 alkyl, a C1-C10 alkene, a C1-C10 alkyne; an aryl, optionally substituted into C6-C20; R⁶ represents a hydrogen, a halogen, a C1-C10 alkyl, a C1-C10 alkene, a C1-C10 alkyne, an aryl optionally substituted into C6-C20; R⁷ represents a hydrogen, a C1-C10 alkyl, a C1-C10 alkene, a C1-C10 alkyne; R⁸ represents a hydrogen, a C1-C10 alkyl, a C1-C10 alkene, a C1-C10 alkyne; and R⁹ is selected among -CN, -CNO, -CNS, -NCO, and -NCS. The invention also concerns a derived conjugate and the use of said derivative and

said conjugate in a diagnostic composition, a reagent and a device.
[French]

⚡ Attorney, Agent
or Firm:

CABINET GERMAIN & MAUREAU ;

⚡ INPADOC

[Show legal status actions](#)

Get Now: [Family Legal Status Report](#)

Legal Status:

⚡ Designated
Country:

AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE
ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC
LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU
SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW,
European patent: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU
MC NL PT SE, **OAPI patent:** BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML
MR NE SN TD TG, **ARIPO patent:** GH GM KE LS MW SD SL SZ UG
ZW, **Eurasian patent:** AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM

⚡ Family:

[Show 7 known family members](#)

⚡ First Claim:

[Show all claims](#)

REVENDECATIONS 1. Dérivé saturé ou insaturé de l'abiétane de
formule générale (I)

⚡ Description


[Expand description](#)

**+ DERIVES SATURES ET INSATURES DE L'ABIETANE,
CONJUGUES DERIVES ET UTILISATIONS DANS UNE
COMPOSITION DIAGNOSTIQUE, UN REACTIF ET UN
DISPOSITIF** La présente invention a pour objet de nouveaux
dérivés de l'abiétane, de nouveaux conjugués dérivés de
l'abiétane et leurs utilisations.

Les nouveaux dérivés comprennent le squelette de base de
l'abiétane qui répond à la formule ci-dessous 12 15 17 il 1 9 14 2 1
~1 1 6 19 18 ladite molécule comprenant en position 18 un
groupement fonctionnel réactif Z.

⚡ Forward
References:

Go to Result Set: [Forward references \(1\)](#)

PDF	Patent	Pub.Date	Inventor	Assignee	Title
	US7060441	2006-06-13	Bourget; Cecile	Biomerieux	Method for fragmenting and label involving abasic sites and phospho labeling

⚡ Other Abstract
Info:

CHEMABS 132(13)166361N CHEMABS 132(13)166361N [DERABS C2000-239603](#)



[Nominate this for the Gallery...](#)



Copyright © 1997-2006 The Thor

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact U](#)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07C 243/36, C07D 207/46, C07K 5/06, C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/58</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/07982 (43) Date de publication internationale: 17 février 2000 (17.02.00)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01846 (22) Date de dépôt international: 27 juillet 1999 (27.07.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/10084 31 juillet 1998 (31.07.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHARLES, Marie-Hélène [FR/FR]; La Lamberte, Chemin du Vernon, F-69420 Condrieu (FR). PIGA, Nadia [FR/FR]; 2, place d'Helvétie, F-69130 Ecully (FR). BATTAIL-POIROT, Nicole [FR/FR]; 6, quai Jules-Courmont, F-69002 Lyon (FR). VERON, Laurent [FR/FR]; 5, rue des Granges, F-69005 Lyon (FR). DELAIR, Thierry [FR/FR]; Le Coin, F-69700 Echalas (FR). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). (74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: SATURATED AND UNSATURATED ABIETANE DERIVATIVES, DERIVED CONJUGATES AND USES IN A DIAGNOSTIC COMPOSITION, A REAGENT AND A DEVICE</p>		
<p>(54) Titre: DERIVES SATURES ET INSATURES DE L'ABIETANE, CONJUGUES DERIVES ET UTILISATIONS DANS UNE COMPOSITION DIAGNOSTIQUE, UN REACTIF ET UN DISPOSITIF</p>		
<div style="text-align: center;"> <p>(1)</p> </div>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a saturated or unsaturated abietane derivative of general formula (I) wherein: Z is selected among -COOR⁵, -CONR¹R², -COONR³R⁴, -COR⁶, -CON, -COOR⁵, -CHOHR⁷, -SR⁸, -OR⁸, -CN, -CNO, -CNS, -NCO, -NCS, -R¹R²CR⁹; wherein R¹, R², R³ and R⁴ represent a hydrogen atom, a C₁-C₁₀ alkyl, a C₆-C₂₀ aryl optionally substituted; a C₇-C₁₀ alkene; a C₁-C₁₀ alkyne; an aminoacyl or peptidyl optionally substituted; or R¹ and R² or R³ and R⁴ together can form a cycle or a heterocycle; R⁵ represents a hydrogen, a C₁-C₁₀ alkyl, a C₁-C₁₀ alkene, a C₁-C₁₀ alkyne; an aryl, optionally substituted into C₆-C₂₀; R⁶ represents a hydrogen, a halogen, a C₁-C₁₀ alkyl, a C₁-C₁₀ alkene, a C₁-C₁₀ alkyne, an aryl optionally substituted into C₆-C₂₀; R⁷ represents a hydrogen, a C₁-C₁₀ alkyl, a C₁-C₁₀ alkene, a C₁-C₁₀ alkyne; R⁸ represents a hydrogen, a C₁-C₁₀ alkyl, a C₁-C₁₀ alkene, a C₁-C₁₀ alkyne; and R⁹ is selected among -CN, -CNO, -CNS, -NCO, and -NCS. The invention also concerns a derived conjugate and the use of said derivative and said conjugate in a diagnostic composition, a reagent and a device.</p>		

(57) Abrégé

L'invention concerne un dérivé saturé ou insaturé de l'abiétane de formule générale (I), dans laquelle Z est choisi parmi $-\text{COOR}^5$, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, $-\text{COONR}^3\text{R}^4$, $-\text{COR}^6$, $-\text{CON}$, $-\text{COOR}^5$, $-\text{CHOHR}^7$, $-\text{SR}^8$, $-\text{OR}^8$, $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, $-\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}^9$; où R^1 , R^2 , R^3 et R^4 représentent un atome d'hydrogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un aryle en $\text{C}_6\text{--C}_{20}$, éventuellement substitué; un alcène en $\text{C}_7\text{--C}_{10}$; un alcyne en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$; un aminoacyle ou peptidyle éventuellement substitué, ou R^1 et R^2 ou R^3 et R^4 ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle; R^5 représente un hydrogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un alcène en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un alcyne en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un aryle, éventuellement substitué en $\text{C}_6\text{--C}_{20}$; R^6 représente un hydrogène, un halogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un alcène en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un alcyne en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un aryle, éventuellement substitué en $\text{C}_6\text{--C}_{20}$; R^7 représente un hydrogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un alcène en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un alcyne en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$; R^8 représente un hydrogène, un alkyle en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un alcène en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$, un alcyne en $\text{C}_1\text{--C}_{10}$; et R^9 est choisi parmi $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$ et $-\text{NCS}$; un conjugué dérivé et l'utilisation de ce dérivé et de ce conjugué dans une composition diagnostique, un réactif et un dispositif.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

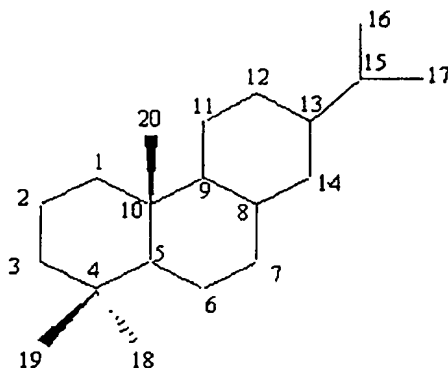
Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

DERIVES SATURES ET INSATURES DE L'ABIETANE, CONJUGUES
DERIVES ET UTILISATIONS DANS UNE COMPOSITION DIAGNOSTIQUE,
UN REACTIF ET UN DISPOSITIF

5 La présente invention a pour objet de nouveaux
dérivés de l'abiétane, de nouveaux conjugués dérivés de
l'abiétane et leurs utilisations.

 Les nouveaux dérivés comprennent le squelette de
10 base de l'abiétane qui répond à la formule ci-dessous



ladite molécule comprenant en position 18 un groupement
fonctionnel réactif Z.

15

 Les nouveaux dérivés de l'abiétane sont
utilisables dans un grand nombre d'analyses. A titre
d'exemple, ils peuvent être utilisés directement ou
indirectement pour le développement de nouveaux tests de
20 diagnostic ; dans le suivi d'une infection, par exemple
d'une infection virale ; dans le suivi et/ou le dosage de
produits chimiques et en particulier de produits
potentiellement polluants.

Dans des tests de diagnostic , ils peuvent être utilisés soit comme marqueurs, soit pour constituer une phase solide universelle, soit pour la production
5 d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux utilisables à des fins diagnostiques. A ce titre, ils peuvent avantageusement se substituer à la biotine pour développer de nouveaux tests de diagnostic. En effet, il s'agit de molécules chimiques que l'on ne retrouve pas chez l'être
10 humain, en particulier dans le sérum, ce qui signifie qu'ils permettent d'éviter de potentielles interactions avec des molécules biologiques.

Dans le dosage et/ou le suivi de produits chimiques, les dérivés de l'abiétane selon l'invention
15 étant chimiquement relativement inertes, ils peuvent être utilisés comme marqueurs dans de nombreux tests de dosage de composés chimiques sans perturber les propriétés physiques et/ou chimiques et/ou physico-chimiques de ces derniers.

20 Sur le plan de la synthèse, étant monofonctionnels, ils sont aisément synthétisables de façon chimiospécifique.

A titre d'exemple, on développera maintenant
25 quelques applications des nouveaux dérivés de l'abiétane dans des tests de dosages immunologiques :

Utilisation desdits dérivés comme marqueurs dans un test de diagnostic :

Les nouveaux dérivés de l'abiétane peuvent être
30 utilisés comme marqueurs dans un test d'immunoanalyse par exemple pour le dosage et/ou la quantification d'anticorps spécifiques d'un antigène dans un échantillon biologique par technique de compétition. A cet effet, l'antigène est fixé sur une phase solide, telle que par exemple

représentée par un puits d'une plaque de microtitration. L'échantillon biologique à doser et une quantité déterminée d'un anticorps conjugué à un dérivé de l'abiétane sont ajoutés à la phase solide, et on détecte
5 la formation de complexes antigène / anticorps conjugués à un dérivé de l'abiétane à l'aide d'un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane, ledit anticorps étant marqué par tout marqueur approprié. De manière similaire, les dérivés de l'abiétane peuvent être utilisés comme
10 marqueurs dans un test pour le dosage et/ou la quantification d'un antigène dans un échantillon biologique par technique de compétition. Dans ce cas, un anticorps spécifique de l'antigène à doser est fixé sur une phase solide et on ajoute à la phase solide ainsi
15 constituée à la fois l'échantillon biologique susceptible de contenir l'antigène recherché et une quantité prédéterminée d'un dérivé de l'antigène conjugué à un dérivé de l'abiétane. La formation des complexes anticorps / dérivé de l'antigène conjugué à un dérivé de
20 l'abiétane est ensuite mise en évidence par l'addition d'un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane, ledit anticorps étant marqué par tout marqueur approprié. De même, les dérivés de l'abiétane sont utilisables comme marqueurs dans une technique sandwich pour la recherche
25 d'un antigène ou d'un anticorps dans un échantillon. A cet effet, le complexe immun anticorps/antigène de l'échantillon est mis en évidence par complexation avec un second anticorps conjugué à un dérivé de l'abiétane ou par complexation avec un second antigène conjugué à un dérivé
30 de l'abiétane et la révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane marqué, ledit anticorps étant marqué par tout marqueur approprié.

Les dérivés de l'abiétane précités sont couplés à une molécule biologique, telle qu'une protéine choisie

parmi les anticorps, les antigènes et les polypeptides, directement ou indirectement. Indirectement, ils sont couplés par l'intermédiaire de composés ayant au moins deux fonctions réactives, identiques ou différentes, tels
5 que des bras espaceurs ou des polymères naturels ou de synthèse définis plus en détail ci-après. Les dérivés de l'abiétane ainsi couplés sont utilisés dans un réactif pour le diagnostic. Ainsi, la présente invention a aussi pour objet un réactif comprenant en outre un dérivé de
10 l'abiétane couplé à une protéine choisie parmi les polypeptides, les antigènes et les anticorps.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un tel réactif dans un test de diagnostic et une composition comprenant en outre un réactif tel que défini ci-dessus.

15

Utilisation des dérivés de l'abiétane pour la constitution d'une phase solide universelle :

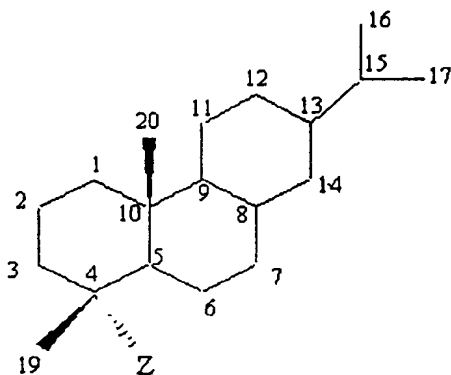
A titre d'exemple, des anticorps dirigés contre un dérivé de l'abiétane sont immobilisés sur une phase ou
20 support solide, directement ou indirectement, et un polypeptide ou un oligonucléotide est modifié par fixation à une de ses extrémités d'un dérivé de l'abiétane. Le complexe anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane / dérivé de l'abiétane-polypeptide ou le
25 complexe anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane / dérivé de l'abiétane-oligonucléotide est ensuite utilisé selon les techniques usuelles sandwich ou par compétition. La phase solide universelle est constituée par l'ensemble phase solide / anticorps dirigé
30 contre un dérivé de l'abiétane. La présente invention a donc également pour objet un dispositif comprenant outre la phase ou support solide un anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre un dérivé de l'abiétane, ledit anticorps étant immobilisé directement ou indirectement

sur ladite phase ou support solide. De préférence, l'anticorps est un anticorps monoclonal obtenu selon des techniques connues, à titre de référence celle décrite dans l'exemple 10.

5 Les dérivés de l'invention peuvent être utilisés pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques dans un milieu liquide, en particulier dans un milieu aqueux, par technique sandwich ou par technique de compétition comme décrit précédemment pour les tests de diagnostic.

10

Aussi, la présente invention a pour objet de nouveaux dérivés saturés ou insaturés de l'abiétane répondant à la formule générique (I) :



15

dans laquelle Z est choisi dans le groupe consistant en $-\text{COOR}^5$, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, $-\text{COONR}^3\text{R}^4$, $-\text{COR}^6$, $-\text{CON}$, $-\text{COOR}^5$, $-\text{CHOHR}^7$, $-\text{SR}^8$, $-\text{OR}^8$, $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, $-\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}^9$;

20

dans lesquels R^1 , R^2 , R^3 et R^4 , indépendamment les uns des autres représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle de préférence comprenant de 6 à 20 atomes de carbone, éventuellement substitué; un radical alcène

25

comprenant de 7 à 10 atomes de carbone; un radical alcyne

comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; un radical aminoacyle ou peptidyle éventuellement substitué, ou R¹ et R² ou R³ et R⁴ ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle ; R⁵ représente un atome d'hydrogène, un
 5 radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R⁶ représente un atome d'hydrogène,
 10 un halogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R⁷ représente un
 15 atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; R⁸ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un
 20 radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; et R⁹ est choisi parmi -CN, -CNO, -CNS, -NCO et -NCS ;

à la condition que

(a) si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé
 25 saturé :

- Z ne représente pas l'un quelconque des radicaux suivants : -COOH, -NCO, -CONH₂, -CN,
 N-benzylamide, N-isopropylamide,
 30 N-cyclohexylamide, N-cyclopentylamide, N-alpha-phényléthylamide, N,N-dibenzylamide, N-méthyl-N-cyclohexylamide, N-méthyl-N-phénylamide,
 N-phényl-N-benzylamide, anilide, et
 -CONH[-(CH₂)_m-C₆H_{5-n}X'_n] où m est égal à 0 ou 1, n

est égal à 1, 2 ou 3, et X' représente un atome d'halogène, un groupe alkyle inférieur, un groupe haloalkyle, un groupe hydroxyle, un groupe alcoxy inférieur, un groupe nitro, un
5 groupe carbonyle, un groupe carboalcoxy et un groupe méthyle,

et

(b) si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé insaturé :

- 10 - Z ne représente pas l'un quelconque des radicaux suivants : -COOH, N-isopropylamide, N-méthyl-N-cyclohexylamide, N-cyclohexylamide, N-décylamide, N-dodécylamide, N-pentadécylamide,
15 N-allylamide, N,N-diallylamide, N-cycloheptylamide, N-cyclopentylamide, N-benzylamide, N-alpha-phényléthylamide, N-alpha-phénylpropylamide, N,N-dibenzylamide, N-béta-phényléthylamide, N-éthyl-N-benzylamide,
20 N-méthyl-N-phénylamide, anilide, et -CONH[-(CH₂)_m-C₆H_{5-n}X'_n] où m est égal à 0 ou 1, n est égal à 1, 2 ou 3, et X' représente un atome d'halogène, un groupe alkyle inférieur, un groupe haloalkyle, un groupe hydroxyle, un
25 groupe alcoxy inférieur, un groupe nitro, un groupe carbonyle, un groupe carboalcoxy et un groupe méthyle,
- Si Z représente -COOR⁵, R⁵ ne représente ni H, ni un radical méthyle, éthyle
30 ou benzyle,
- Si Z représente -CONR¹R², et si l'un de R¹ et R² représente H, l'autre de R¹ et R² ne représente pas H, et si l'un de R¹ et R²

représente le radical éthyle, l'autre de R^1 et R^2 ne représente pas le radical éthyle,

- Si Z représente $-COR^6$ ou $-CHOH R^7$, R^6 et R^7 ne représentent pas H.

5 Par dérivé saturé de l'abiétane, on entend un dérivé ayant le squelette de l'abiétane précité dans lequel les trois cycles et le groupe latéral en position 13 ne comportent aucune insaturation, indépendamment de la définition de Z. Par dérivé insaturé, on comprend un
10 dérivé ayant le squelette de l'abiétane dans lequel au moins l'un des trois cycles et/ou le groupe latéral en position 13 comporte une insaturation. A titre d'exemple de dérivé insaturé, on peut citer ceux dont le squelette est choisi parmi les squelettes de l'acide abiétique, de
15 l'acide déhydroabiétique, de l'acide néoabiétique, indépendamment de la définition de Z.

Les radicaux alkyles mentionnés ci-dessus comprennent de préférence de 1 à 6 atomes de carbone. Ils
20 peuvent être linéaires ou ramifiés. De préférence, ce sont des radicaux linéaires. Un radical alkyle peut être interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes et/ou substitué ou non substitué.

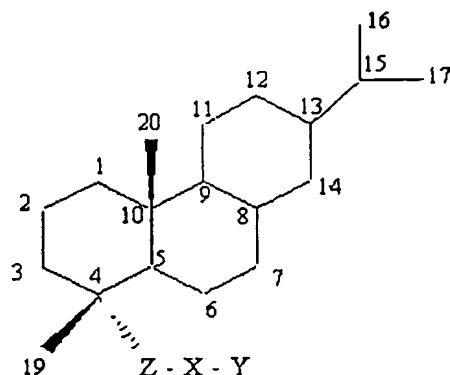
25 Les radicaux ayles mentionnés précédemment comprennent de préférence de 6 à 14 atomes de carbone. Il peut s'agir de composés cycliques ou hétérocycliques, éventuellement substitués, en particulier par des hétéroatomes ou des groupes d'hétéroatomes, tels que des
30 groupements nitro, sulfonique et sulfonate.

Avantageusement, $-COONR^3R^4$ représente un ester de N-hydroxysuccinimide, $-COR^6$ représente un chlorure d'acide, $-CONR^1R^2$ représente un groupement amide N-substitué dans

lequel R^1 et R^2 indépendamment l'un de l'autre représente un atome d'hydrogène ou un radical polyéthylèneglycol et avantageusement un radical tétra ou hexaéthylèneglycol ou encore un radical peptidyle éventuellement substitué
 5 comprenant de 2 à 6 résidus aminoacyles. De préférence, le radical peptidyle est un radical glycyL-glycine et avantageusement le radical glycyL-glycine est substitué par la N-hydroxysuccinimide ; $-COOR^5$ de préférence représente un ester de polyéthylèneglycol et
 10 avantageusement un ester de tétra ou hexaéthylèneglycol.

La présente invention a aussi pour objet de nouveaux conjugués dérivés de l'abiétane qui répondent à la formule générale (II)

15



dans laquelle, Z représente un radical tel que défini dans la formule (I) précédente ; X représente un bras espaceur choisi parmi une chaîne aliphatique $(CH_2)_n$
 20 dans laquelle n est un nombre entier compris entre 0 et 10 et de préférence égal à 6, un éthylène glycol ou un polyéthylèneglycol, de préférence un tétra ou hexaéthylèneglycol, un résidu aminoacyle ou peptidyle et en particulier une chaîne peptidique comprenant de 2 à 10
 25 acides aminés ; Y représente un polymère choisi parmi les

protéines, les polypeptides, les polynucléotides ou oligonucléotides et les polymères chimiques ;

à la condition que si ledit conjugué comprend un dérivé insaturé de l'abiétane Y ne soit pas la BSA.

5

Par polymère, on entend une molécule ou une macromolécule constituée d'au moins deux unités monomères.

Ainsi, une protéine, est une macromolécule, d'origine naturelle ou obtenue par voie de synthèse ou par technique de recombinaison génétique, présentant une masse
10 moléculaire moyenne d'environ au moins 200 daltons.

Un polypeptide correspond à un enchaînement d'au moins deux acides aminés, de préférence de 2 à 20 acides aminés et ses équivalents ; lesdits polypeptides étant
15 obtenus et/ou par voie de synthèse chimique et/ou par fragmentation d'une protéine native à l'aide d'enzymes de restriction appropriées et/ou par recombinaison génétique. Un polypeptide est dit équivalent par rapport à un polypeptide de référence s'il présente sensiblement les
20 mêmes propriétés, et notamment les mêmes propriétés antigéniques, immunologiques, enzymologiques et/ou de reconnaissance moléculaire. Est notamment équivalent à un polypeptide de référence : tout polypeptide possédant une séquence dont au moins un acide aminé est substitué par un
25 acide aminé analogue, c'est à dire un acide aminé qui présente sensiblement les mêmes caractéristiques physico-chimiques qu'un acide aminé de référence ; tout polypeptide présentant une séquence peptidique équivalente, obtenue par variation naturelle ou induite du
30 polypeptide de référence et/ou du fragment nucléotidique codant pour ledit polypeptide ; un mimotope, tout polypeptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un ou plusieurs acides aminés de la série D et vice versa ; tout

polypeptide dans la séquence duquel on a introduit une modification des chaînes latérales d'au moins un acide aminé, telle que par exemple une acétylation des fonctions amines, une carboxylation des fonctions thiols, une
5 estérification des fonctions carboxyliques ; tout polypeptide dans la séquence duquel une ou des liaisons peptidiques ont été modifiées, comme par exemple les liaisons carba, rétro, inverso, rétro-inverso, méthylène-oxy et tout polypeptide dont au moins un antigène est
10 reconnu par un anticorps dirigé contre un peptide de référence.

Un polynucléotide ou oligonucléotide correspond à un enchaînement d'au moins deux unités monomères, en particulier d'au moins cinq monomères et, de préférence de
15 5 à 22 monomères, avantageusement de 18 à 22 monomères et préférentiellement de 20 monomères, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptible de s'hybrider dans des conditions prédéterminées à un fragment nucléotidique, l'enchaînement
20 pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu par voie de synthèse chimique et/ou par fragmentation d'un acide nucléique naturel et/ou par recombinaison génétique. Ainsi, un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments
25 constitutifs sont une base azotée, un sucre et un groupement phosphate, ou un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine,
30 la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine,, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou tout autre base modifiés permettant l'hybridation ; au niveau du sucre par exemple par le remplacement d'au moins un désoxyribose par un

polyamide (P.E. Nielsen et al., Science, 254,1497-1500 (1991)) ; au niveau du groupement phosphate par exemple par son remplacement par des esters choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de
5 phosphorothioate. Ces modifications peuvent être prises en combinaison.

Par " séquence informationnelle ", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une
10 information correspondant à celle des acides nucléiques naturels.

Un polymère chimique correspond à l'enchaînement d'au moins deux unités monomères, identiques ou différentes. De préférence, il présente une masse
15 moléculaire moyenne comprise entre 1000 et 100 000. Ce polymère est de préférence choisi parmi les homopolymères d'anhydride maléique, les copolymères à base d'anhydride maléique, les copolymères à base de N-vinylpyrrolidone et les polysaccharides. En particulier, le polymère est
20 choisi parmi les poly (anhydride maléique-éthylène), les poly (anhydride maléique-propylène), les poly (anhydride maléique-méthyl-vinyléther) (AMVE) ; le N-vinyl pyrrolidone-N-acryloxysuccinimide (NVP-NAS) et les polysaccharides.

25

Selon l'invention, X est avantageusement choisi parmi une chaîne aliphatique $(CH_2)_n$ dans laquelle n est un nombre entier égal à 6, un éthylène glycol, un tétra ou hexaéthylèneglycol, un résidu peptidyle comprenant de 2 à
30 10 acides aminés; et Y représente un polymère choisi parmi la BSA, les oligonucléotides de 18 à 22 mers, les homopolymères d'anhydride maléique, les copolymères à base d'anhydride maléique, les copolymères à base de N-vinylpyrrolidone, les polysaccharides.

En particulier, le polymère est choisi parmi les oligonucléotides de 20 mers et en particulier l'oligonucléotide dénommé sous la référence SEQ ID NO 2 et décrit ultérieurement dans l'exemple 5, les poly (anhydride maléique-éthylène), les poly (anhydride maléique-propylène), les poly (anhydride maléique-méthyl-vinyléther) (AMVE) et le N-vinyl pyrrolidone-N-acryloxysuccinimide (NVP-NAS). Avantageusement, le polymère est couplé à au moins une protéine et/ou un polypeptide et/ou un oligonucléotide.

Les nouveaux conjugués dérivés de l'abiétane sont utilisables dans un grand nombre d'analyses. A titre d'exemple, lesdits conjugués dérivés de l'abiétane sont utilisés dans des tests de diagnostic, tels que des essais immunologiques ou dans des essais utilisant la technologie des sondes ; dans le suivi d'une infection, par exemple d'une infection virale ; dans le suivi et/ou le dosage de produits chimiques et en particulier de produits potentiellement polluants.

A titre d'exemple, ils peuvent être utilisés dans un test de diagnostic immunologique comme marqueurs comme décrit au préalable pour les dérivés de l'abiétane ou dans des essais utilisant la technologie des sondes pour la détection et/ou la quantification d'un fragment d'acide nucléique dans un échantillon biologique.

Dans la technologie des sondes, ils peuvent être utilisés indifféremment comme sondes de capture et/ou de détection. Ainsi dans la technologie dite sandwich, ils peuvent être utilisés comme sonde de détection selon le protocole suivant : une sonde de capture est immobilisée sur un support solide, la phase de capture ainsi constituée est mise en contact avec la séquence cible de l'échantillon et avec un conjugué dérivé de l'abiétane qui consiste en un oligonucléotide couplé à un dérivé de

l'abiétane. Le complexe éventuellement formé est ensuite détecté par addition d'un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane, ledit anticorps étant marqué par tout marqueur approprié. Ils peuvent être également
5 utilisés comme sonde de capture. A cet égard, le conjugué dérivé de l'abiétane qui consiste en un oligonucléotide couplé à un dérivé de l'abiétane est immobilisé sur un support solide. La phase de capture ainsi constituée est mise en contact avec la séquence cible de l'échantillon et
10 le complexe éventuellement formé est détecté par une sonde de détection marquée par tout marqueur approprié. La capture peut être réalisée directement ou indirectement, c'est à dire soit le conjugué est immobilisé directement sur le support solide, soit il est immobilisé
15 indirectement par couplage à un anticorps dirigé contre le dérivé de l'abiétane, fixé au préalable sur le support solide. Bien entendu, la technique sandwich peut être effectuée en une étape ou deux étapes. De même, les conjugués de l'invention peuvent être utilisés pour la
20 détection d'une séquence cible dans un échantillon à la fois comme sonde de capture et de détection. Il est à la portée de l'homme de l'art de définir la séquence et la longueur de l'oligonucléotide du conjugué en fonction de la séquence de la cible recherchée dans l'échantillon. Il
25 est également à la portée de l'homme de l'art de définir des sondes de capture et/ou de détection spécifiques de la cible recherchée.

La présente invention a donc également pour objet un réactif et une composition diagnostique comprenant
30 ledit réactif, ce dernier comprenant :

- un dérivé saturé ou insaturé de l'abiétane répondant à la formule (I) précédente dans laquelle Z est choisi dans le groupe consistant en $-COOR^5$, $-CONR^1R^2$,

-COONR³R⁴, -COR⁶, -CON, -COOR⁵, -CHOHR⁷, -SR⁸, -OR⁸, -CN, -CNO, -CNS, -NCO, -NCS, -R¹R²CR³ ;

où R¹, R², R³ et R⁴, indépendamment les uns des autres représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle de préférence comprenant de 6 à 20 atomes de carbone, éventuellement substitué ; un radical alcène comprenant de 7 à 10 atomes de carbone ; un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; un radical aminoacyle ou peptidyle éventuellement substitué, ou R¹ et R² ou R³ et R⁴ ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle ; R⁵ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone ; R⁶ représente un atome d'hydrogène, un halogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone ; R⁷ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; R⁸ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; et R⁹ est choisi parmi -CN, -CNO, -CNS, -NCO et -NCS ;

à la condition que si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé insaturé, Z ne représente pas un radical acide carboxylique, ou

- un conjugué tel que défini précédemment.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un réactif de l'invention dans un test de diagnostic.

Les conjugués de l'invention peuvent être utilisés également pour développer des phases de capture universelles. Par exemple, des anticorps dirigés contre un dérivé de l'abiétane sont immobilisés, directement ou indirectement, sur une phase ou un support solide et l'oligonucléotide du conjugué de l'invention est modifié par fixation à une de ses extrémités, de préférence au niveau de l'extrémité 5', d'un dérivé de l'abiétane. La phase solide universelle est constituée par l'ensemble phase solide / anticorps dirigé contre un dérivé de l'abiétane. Un autre objet de l'invention est donc un dispositif comprenant outre la phase ou le support solide un anticorps polyclonal ou monoclonal immobilisé directement ou indirectement sur la phase ou le support solide. L'anticorps est de préférence un anticorps monoclonal obtenu selon des techniques connues et en particulier selon la technique décrite dans l'exemple 10.

Un conjugué de l'invention comprenant un polymère chimique peut également être utilisé comme marqueur ou pour développer une phase de capture universelle, comme décrit précédemment.

Un conjugué de l'invention peut être utilisé comme immunogène, pour l'immunisation d'organismes appropriés, tels que des animaux, pour la production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux. L'invention a donc aussi pour objet un réactif et une composition diagnostiques comprenant en outre lesdits anticorps monoclonaux ou polyclonaux et de préférence des anticorps monoclonaux obtenus selon des techniques connues, comme celle décrite à l'exemple 10. L'invention comprend également l'utilisation dudit réactif dans un test de diagnostic.

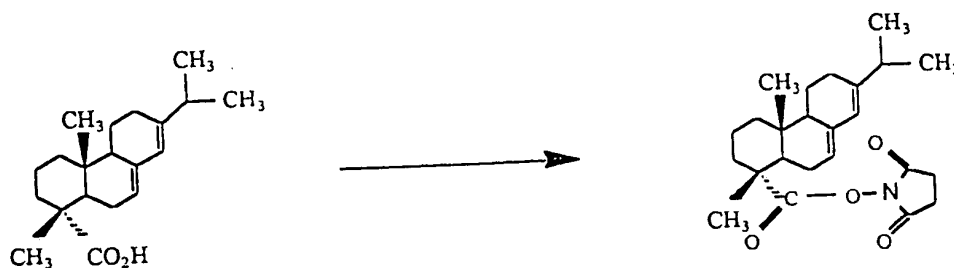
Par ailleurs, un conjugué de l'invention peut être utilisé pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques, par technique de compétition ou par la technique dite sandwich. Ainsi, la présente invention a également pour objet une composition comprenant en outre un conjugué de l'invention et un anticorps polyclonal ou monoclonal obtenu par immunisation d'organismes appropriés à l'aide de l'immunogène précité, de préférence un anticorps monoclonal anti-acide abiétique obtenu par immunisation d'un animal selon des techniques connues, telles que celle décrite ultérieurement dans l'exemple 10. L'invention se rapporte également à l'utilisation d'une composition telle que définie précédemment pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques.

15

La figure annexée représente les signaux obtenus lors la détection en ELISA de l'antigène alpha foeto-protéine soit par utilisation d'un anticorps polyclonal anti- alpha foeto-protéine (symboles ronds), soit par utilisation d'un conjugué de l'invention AMVE/acide abiétique hydrazide/ anticorps polyclonal anti-alpha foeto-protéine (symboles carrés). En abscisse sont représentées les quantités d'alpha foeto-protéine en ng/ml et en ordonnée les DO à 492 nm.

25

Exemple 1 : synthèse de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide abiétique



Dans un ballon monocol de 100 ml sous atmosphère d'azote, 1 gramme d'acide abiétique (3,3 mmol-1 équivalent (1 eq)) est dissout dans 40 ml de CH_2Cl_2 à la température de 0°C . 1,1 eq de N-hydroxysucciminide est ajouté. 1 eq de DDC est ensuite ajouté goutte à goutte, soit 0,825 ml d'une solution à 4 mol/l dans du CH_2Cl_2 anhydride. La réaction est effectuée pendant 5 h à -20°C , puis le milieu est dilué dans 200 ml d'éther et ensuite précipité pendant 24 h à -20°C . Après filtration sur verre fritté, les eaux mères sont évaporées. La purification est effectuée sur 75 fois le poids de silice en éluant avec le mélange pentane/AcEtOH/ CHCl_3 (65/25/10). 0,0998 gramme de l'ester $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}$ est récupéré, soit un rendement de 75%.

$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}$
Mw=399.54 g/mole.

IR: (cm^{-1})

2957 ($\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}$);
1777 ($\text{C}=\text{O}$ cycle NHS);
1740 ($\text{C}=\text{O}$ amide).

RMN:

^1H (ppm)

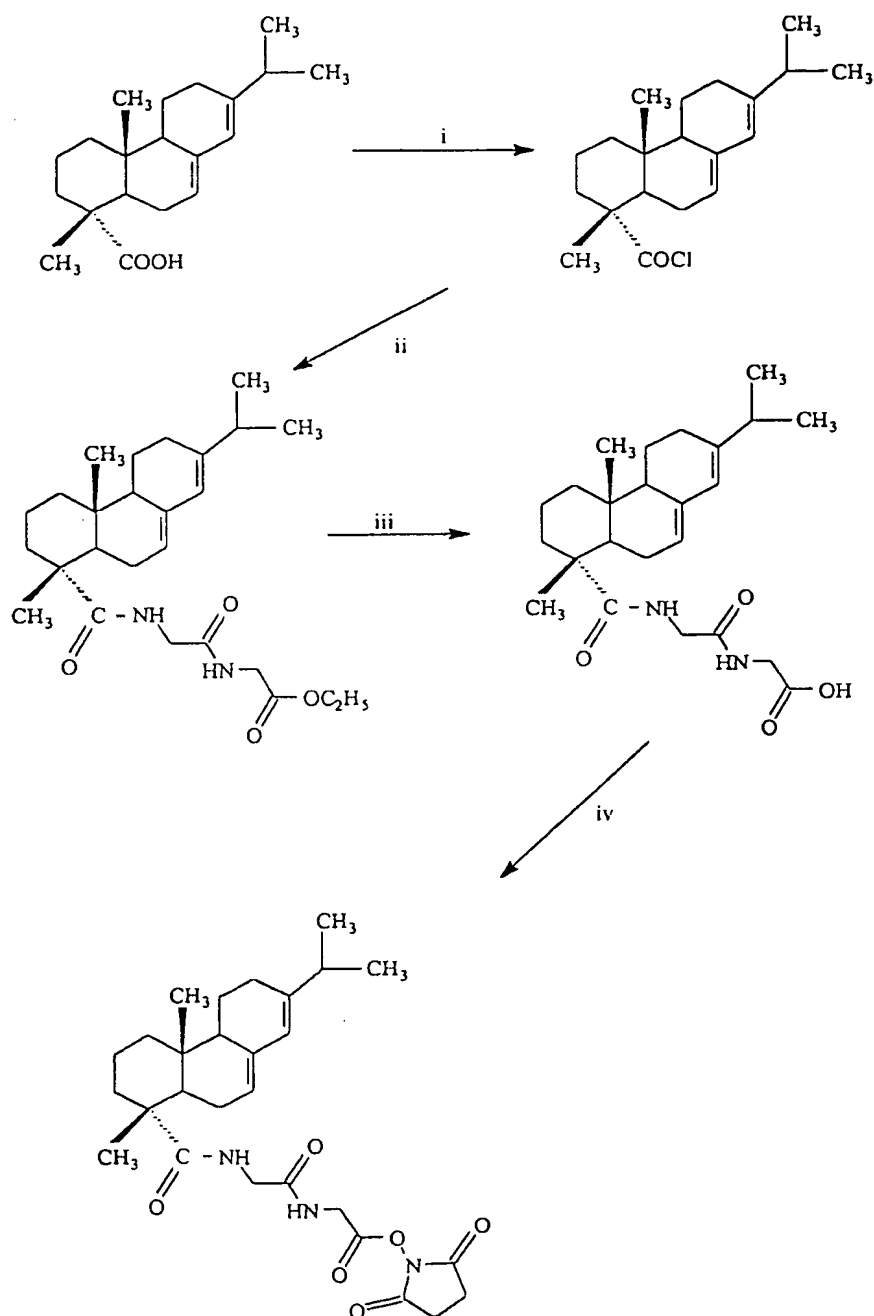
5,74 (s, CH); 5,3 (d, CH); 2,79 (s, CH_2 , NHS); 1,29 (s, CH_3); 1,01 (d, CH_3); 0,98 (d, CH_3); 0,82 (s, CH_3).

^{13}C (ppm)

173,5 ($\text{C}=\text{O}$); 169,2 ($\text{C}=\text{O}$); 145 (C quater.); 135,2 (C quater.); 122,4 ($\text{CH}=\text{}$); 120,4 ($\text{CH}=\text{}$); 25,6 (CH_2 du NHS).

Exemple 2 : synthèse d'un dérivé glycyglycine
activé de l'acide abiétique

La synthèse est effectuée selon le schéma
5 réactionnel décrit ci-dessous :



Synthèse du chlorure d'acide (i):

L'acide abiétique est recristallisé avant de synthétiser le chlorure. Dans un ballon tricol de 100 ml sous atmosphère d'azote, 1,2 gramme d'acide abiétique (3,97 mmol-1eq) sont dissous dans 10 ml de toluène anhydre et refroidi à 0° C. 3 eq soit 1ml de chlorure d'oxalyde sont additionnés en solution dans 3 ml de toluène anhydre. Après 15 min à 0° C, la réaction est laissée 2 h à température ambiante. Le milieu est cannulé dans un ballon monocol et le toluène est éliminé sous vide partiel, puis séché 2 h sous vide. Le produit sera utilisé tel quel pour l'étape suivante. La disparition totale de l'acide est contrôlée en chromatographie sur couche mince (pentane/AcEtOH/CHCl₃ : 65/25/10). Par infrarouge, l'apparition d'une bande à 1775 cm⁻¹ montre la présence de chlorure d'acide (O=C-Cl), ce qui confirme la disparition de la bande acide à 1700 cm⁻¹ et de la bande OH à 3000 cm⁻¹. Le rendement est quantitatif.

Couplage de l'ester éthylique du glycyl-glycine (ii):

1,95 gramme de l'ester éthylique du glycyl-glycine sous la forme d'hydrochlorure (9,92 mmol-1 eq) est dissous en présence de triéthylamine (2 eq) dans 30 ml de diclorométhane anhydre (distillé sur hydrure de calcium) dans un flacon tricol de 100 ml sous azote. Le chlorure de l'acide abiétique (9,92 mmol-1eq) solubilisé dans 15 ml de dichlorométhane anhydre est additionné lentement à la solution précédente. La réaction est laissée 7 h à température ambiante. Les sels d'amodium sont précipités dans 200 ml d'éther, puis filtrés sur verre fritté. Des lavages sont effectués avec HCl 0,1M, puis la phase organique est lavée par une solution saturée de NaCl avant d'être séchée sur Na₂SO₄. Après filtration, le solvant est

éliminé sous vide partiel. Le rendement global sur les deux étapes est de 83%.

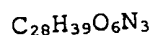
Saponification de l'ester éthylique du glycyl-glycine (iii):

La saponification est réalisée en dissolvant environ 2 grammes d'ester dans 30 ml d'éthanol et en ajoutant lentement environ 5 ml de NaOH. Au bout de 2 h, l'ester a totalement disparu, ce qui est confirmé par les spots de Rf sur silice (éluant 70/30 : éther / acétone) (Rf ester=0,6 Rf acide=0). Le milieu est dilué dans 250 ml d'eau puis lavé trois fois avec 50 ml d'éther. Après acidification par HCl 2N, le composé est extrait par trois fois avec 50 ml d'éther. La phase étherée est lavée avec du NaCl saturé, séchée sur Na₂SO₄, puis filtrée. Le rendement brut est de 86%.

Activation du dérivé glycyl-glycine sous forme d'ester N-hydroxysuccinimide (iv) :

0,2645 gramme de l'acide obtenu dans l'étape précédente (0,635 mmoles-1 eq) est dissous dans 40 ml de CH₂Cl₂, puis 0,111 gramme de N-hydroxysuccinimide est ajouté. Le milieu est refroidi sous atmosphère d'azote à 0° C et 0,63 ml de DCC en solution à 1M dans CH₂Cl₂ est versé en une fois. La réaction est maintenue à température ambiante pendant 5 h et la dicyclohexylurée est précipitée à -20° C pendant 24 h. Le produit (C₂₈H₃₉O₆N₃) est filtré sur 20 fois le poids de silice en éluant par un mélange éther / acétone (80/20). Le rendement est de 20%.

SM (FAB+)



MH⁺ (calc.) = 514.29169 g/mole.

MH⁺ (exp.) = 514.29171 g/mole.

IR: (cm⁻¹)

1643 (C=O amide II)
1740 (C=O amide)
1784, 1823 (C=O NHS)
2937 (CH₃, CH₂, CH)
5 3389 (NH amide)

RMN:

¹H: (ppm)
0.79 (s, CH₃), 0.95 (d, J=1.6 Hz, CH₃), 0.98 (d,
J=1.4 Hz, CH₃), 1.25 (s, CH₃), 2.79 (CH₂, N-
10 hydroxysuccinimide), 4.34 (d, J=5,6 Hz, CH₂), 5,3 (CH),
5.74 (s, CH).

¹³C: (ppm)

Exemple 3 : Synthèse d'un dérivé hydrazide de
15 l'acide abiétique

L'acide abiétique est activée au préalable sous
forme de chlorure, comme décrit dans l'exemple 3. 0,53 g
d'hydrazide t-BOC (4 mmoles) est dissout dans 10 ml de
20 toluène anhydride auquel sont ajoutées 0,6 ml (2 eq) de
triéthylamine sous atmosphère d'azote. 1 eq de chlorure
d'acide en solution dans le toluène sont ajoutés au goutte
à goutte à la température de 0° C. La réaction est laissée
pendant 18 h à température ambiante. Après quoi, on
25 observe l'apparition d'un précipité. Le milieu est
acidifié par ajout de 4 ml de HCl 1 N, le précipité est
filtré sur verre fritté. Le milieu est dilué dans 50 ml
d'éther et après séchage sur Na₂SO₄, la phase organique est
éaporée sous vide et séchée à la pompe. Le produit est
30 filtré sur 20 fois le poids de silice en éluant avec un
mélange hexane / acétone (80/20). Le produit est isolé
avec un rendement de 47 %.

L'hydrazide t-BOC est clivé dans le dioxane
anhydre par une solution d'HCl anhydre à 4M dans le

dioxane-anhydre. Après 20 h à température ambiante, un précipité apparaît. Un bullage d'azote permet d'entraîner l'HCl restant. L'évaporation au rotavap élimine l'acide et le dioxane. Le résidu est ensuite repris dans de l'éther puis filtré sur verre fritté. Le rendement en brut est de 54 %.

Exemple 4 : Synthèse d'un dérivé glycyglycine hydrazide de l'acide abiétique

10

1 ml d'hydrate d'hydrazine (19 mmole-21 eq) en solution dans 5 ml de dioxane anhydre sont agités vigoureusement. 0,4777 g d'ester obtenu selon l'exemple 3 (0,93 mmol-1 eq) en solution dans 45 ml de dioxane anhydre sont ajoutés en 1 h 30. Un précipité apparaît après 50 min de réaction. Après 4 h de réaction, le milieu est précipité dans 250 ml d'éther, la filtration permet d'isoler un composé qui est repris dans CHCl₃ puis séché sous vide après concentration. La dissolution dans CHCl₃ est suivie d'une reprecipitation dans l'éther et 200 mg de produit sont isolés, soit un rendement de 49 %.

20

IR: (cm⁻¹)

1655 (C=O amide II)

2932 (CH₃, CH₂, CH)

25

3319 (NH, NH₂ bande large)

Exemple 5 : couplage de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide abiétique sur un oligonucléotide

30

Des oligonucléotides sont synthétisés sur un appareil automatique 394 de la société APPLIED BIOSYSTEMS en utilisant la chimie des phosphoramidites selon le protocole du constructeur. Pour permettre le couplage d'un

oligonucléotide à l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide
abiétique sur une position bien déterminée, des fonctions
réactives sont introduites sur l'oligonucléotide par
l'intermédiaire de bras de liaison compatibles avec la
5 synthèse automatique, comme décrit dans le brevet FR 93
07093 dont l'enseignement est inclus à titre de référence.

Les oligonucléotides suivants ont été
synthétisés :

10

SEQ ID NO	Nucléotide (*)	Tr (**)
1	bêta	19,54
2	bêta	18,45
3	bêta	19,85
4	alpha	23,21
5	alpha	20,04

SEQ ID NO 1 :

ACTAAAACT AGTAATGCAA AG

22 mers

SEQ ID NO 2 :

15 ATGTCACGAG CAATTAAGCG

20 mers

SEQ ID NO 3 :

ACTAAAACT AGNAATGCAA AG

22 mers

SEQ ID NO 4 :

ACCCCGAGAT TTACGTTATG T

21 mers

20 SEQ ID NO 5 :

TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

20 mers

(*) les nucléotides bêta sont des nucléotides naturels (la
liaison glycosidique est sous la forme anomérique bêta).
Les nucléotides alpha sont des nucléotides non naturels
25 (la liaison glycosidique est sous la forme anomérique
alpha). Les oligonucléotides contenant les nucléotides
alpha ont été préparés selon la technique décrite dans la

demande de brevet PCT WO88/04301, dont le contenu est incorporé à titre de référence.

(**) Tr représente le temps de rétention en minutes de l'oligonucléotide dans les conditions décrites dans le brevet FR 93 07093 cité précédemment.

200 µg de l'oligonucléotide de synthèse SEQ ID NO 2 sont dissous dans 25 µl de tampon carbonate, 0,2 M/NaCl 0,15 M, pH=8,8. 500 µl d'une solution de l'ester $C_{24}H_{33}O_4N$ à 2,5 mg/ml dans du DMSO anhydre sont ajoutés à la solution de l'oligonucléotide. Le mélange est agité vigoureusement puis laissé pendant 4 h à 50°C sur un thermo-mixeur. 10 µl NH_4Cl 1M pH=6 sont ajoutés en fin de réaction. Le milieu est séché au speed-vac, puis repris dans de l'eau. Trois extractions par du butanol sont effectuées pour éliminer ce qui n'a pas réagi. Après lyophilisation, le l'oligonucléotide est repris dans de l'eau bidistillée et analysé par HPLC en phase inverse sur une colonne RP300 avec l'éluant suivant : TEAA 0,1M - TEAA 0,1M/ CH_3CN (50/50). Le profil du chromatogramme montre la présence d'oligonucléotide non modifié et un massif de pics plus hydrophobes contenant l'oligonucléotide couplé à l'ester. Le rendement estimé par intégration de l'aire des pics et en considérant que les coefficients d'extinction moléculaire sont identiques est de 40%.

25

Exemple 6 : Couplage de l'ester $C_{28}H_{39}O_6N_3$ sur un oligonucléotide

Le protocole est identique à celui décrit dans l'exemple 5. 20% de rendement en produit isolé sont obtenus après les extractions au butanol. La purification est effectuée en HPLC.

Exemple 7 : Couplage du dérivé glycyL-glycine hydrazide sur le polymère AMVE

100 µl (1 mg) d'une solution à 10 mg/ml d'AMVE
5 dans le DMSO anhydre sont mis à réagir avec 200 µl (0,2 mg) d'hydrazide glycyL-glycine d'acide abiétique en présence de 20 µl de DIEA et 680 ml de DMSO. La réaction est laissée 17 h à 37 ° C.

10 Exemple 8 : Couplage de l'ester $C_{24}H_{33}O_4N$ sur la BSA

20 mg de BSA (fraction 5-Sigma) sont dissous dans 1 ml de tampon carbonate 0,2 M/NaCl 0,5 M, pH = 8,2. A 40
15 µl de cette solution ($1,212 \times 10^{-8}$ mol) sont ajoutés 960 µl d'une solution d'ester obtenu selon l'exemple 1 à 1 mg/ml (soit 200 eq) dans le DMSO anhydre. Après agitation vive, l'épendorf est agité pendant 5 h à 37° C sur un thermomixeur. Le mélange est dilué dans un grand volume
20 d'eau, puis filtré sur Centricom (nom commercial) PM30 à 7 TPM. L'opération est répétée 3 fois pour éliminer l'ester n'ayant pas réagi et les produits d'hydrolyse, ainsi que pour entraîner le DMSO. Le résidu est séché au speed-vac puis repris dans un volume de 1 ml d'eau bidistillée. Le
25 conjugué est dosé après dilution en mesurant la DO à 280 nm.

Le conjugué obtenu sera injecté à des souris pour induire une réponse immunitaire et la production d'anticorps monoclonaux, comme décrit dans l'exemple 10.

Exemple 9 : Couplage de l'ester $C_{28}H_{39}O_6N_3$ sur la BSA

Le protocole est identique à celui décrit dans l'exemple précédent. Le couplage met en jeu 40 ou 80 eq d'esters NHS. Les conjugués obtenus seront injectés à des souris pour induire une réponse immunitaire et la production d'anticorps monoclonaux, comme décrit dans l'exemple qui suit.

10

Exemple 10 : Obtention d'anticorps monoclonaux anti-acide abiétique

Un antigène de l'acide abiétique couplé sur de la BSA comme décrit respectivement dans les exemples 10 et 11 est utilisé comme immunogène. Chacun des antigènes a été injecté à des souris femelles de l'espèce BALB/C et de la souche BALB/C BYJICO. Les souris sont immunisées à 15 jours d'intervalle à l'aide de trois injections par voie intrapéritonéale associant respectivement 50 μ g d'antigène et de l'adjuvant complet de Freund pour la 1^{ère} injection et de l'adjuvant incomplet de Freund pour les autres injections. La fusion est réalisée avec la lignée myélomateuse SP2/O-AG14, selon la technique classique décrite par Köhler et Milstein (Nature 256, 495-497 1975).

Les cellules ont été cultivées en utilisant un milieu de base: Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM) additionné de bicarbonate de sodium (3024 mg/l), de 10% de sérum de veau foetal (SVF), pH 6,7 à 7,3. Les réactifs additionnels suivants ont été ajoutés: insuline 4 mg/l, 2-mercaptoéthanol (10 μ M), éthanolamine (20 μ M), pénicilline (100 U/ml), et streptomycine (50 μ g/ml). Les cellules hétéropléides obtenues ont été sub-cultivées tous les deux ou trois jours et congelées dans le milieu IMDM additionné

de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO commercialisé par Sigma) d'abord à -80°C pendant 24 à 72 heures, puis conservées dans de l'azote liquide à -180°C.

5 La concentration cellulaire est de $3,6 \times 10^6$ cellules par ampoule (2×10^6 cellules/ml).

La production d'anticorps in vivo a été effectuée par injection intrapéritonéale des lignées d'hybridomes obtenues dans des souris femelles ayant de 4 à 6 semaines,
10 de l'espèce BALB/C, de la souche BALB/C BYJICO.

Exemple 11 : Criblage des anticorps anti-acide abiétique

15 Un criblage a été effectué par la technique ELISA indirect comme suit :

des plaques de polystyrène Maxisorb NUNC (commercialisées par la société Polylabo Paul Block sous la référence 4-39454) sont sensibilisées avec 100 µl
20 d'acide abiétique couplé à un oligonucléotique (ODN) comme décrit dans l'exemple 2 à 0,25 µg/ml d'acide abiétique-ODN dans du tampon PBS x 3 (NaCl 0,45 M ; phosphate de sodium 0,15 M ; pH7,0). Les plaques ont été incubées une nuit à 22°C ou une heure à 37° C. Les plaques ont été saturées
25 avec 100µl de tampon PBS (50mM phosphate et 150mM NaCl, pH 7,2) additionné de 1% d'extrait de lait lyophilisé (Régilait) durant 1 heure à 37°C. 100 µl d'anticorps, dilués dans du PBS-Tween 20 à 0,05 % ont été ajoutés et incubés une heure à 37°C. 100 µl d'immunoglobulines anti-
30 Ig totales de souris conjuguées à la phosphatase alcaline (Jackson Laboratories référence 115-055-062) dilués au 1/2000 dans du tampon PBS-BSA 1% (phosphate buffer saline-bovine sérum albumine) ont été ajoutés et incubés pendant une heure à 37°C. La révélation a été effectuée par

addition de 100 µl de p-nitrophénylphosphate ((pNPP), commercialisé par bioMérieux, référence 60002990) à la concentration de 2 mg/ml dans de la DEA-HCl (commercialisé par bioMérieux, référence 60002989), pH 9,8, et incubation pendant 30 minutes à 37°C. La réaction a ensuite été bloquée avec 100 µl de NaOH 1N. Trois lavages ont été effectués entre chaque étape avec 300 µl de PBS-Tween 20 à 0,05 % et un lavage supplémentaire a été réalisé en eau distillée avant d'ajouter le pNPP.

10

Exemple 12 : Couplage de l'ester $C_{28}H_{39}O_6N_3$ sur un anticorps anti-alpha-foeto-protéine (anti-AFP)

Le dérivé N-hydroxysuccinimide est couplé à un anticorps monoclonal anti-AFP dans un mélange tampon borate de sodium 0,1M pH 9,2 contenant 8% en volume de diméthylsulfoxyde. Le rapport molaire anticorps / dérivé est 1/45. Le milieu réactionnel est agité 4 heures à température ambiante, avant d'être dialysé contre du PBS.

- Mise en évidence immunologique du greffage du dérivé de l'acide abiétique sur l'anticorps.

Les puits d'une plaque de microtitration NUNC MAXISORB sont sensibilisés pendant deux heures à 37°C avec une solution de l'anticorps obtenu précédemment dilué à 10µg/ml dans un tampon carbonate 50 mM. Après lavage au PBS- 0.5% Tween 20, des solutions d'anticorps anti-acide abiétique marqués à la peroxydase dilués dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval sont incubées une heure à 37°C. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine, la réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les signaux spécifiques obtenus sont de 2500 milliabsorbances.

Exemple 13 : Couplage du dérivé glycyL-glycine hydrazide sur polymère et greffage sur anticorps anti-alpha foeto protéine (AFP)

5 10 µl (150 µg) d'une solution à 15 mg/ml d'AMVE dans du DMSO anhydre sont mis à réagir avec 10 µl (2 µg) d'hydrazide glycyL-glycine de l'acide abiétique en présence de 980 µl de DMSO anhydre. Le mélange est agité vivement pendant 5 min, puis 15 µl de ce milieu sont
10 additionnés à 1 ml d'anticorps anti-AFP polyclonal à 0,5 mg/ml dans un tampon Tris 50 mM, pH = 9,2. Le couplage est effectué pendant 1 nuit à 37° C.

Exemple 14 : Couplage de l'acide abiétique et d'un
15 anticorps polyclonal de lapin anti-alpha foeto-protéine sur la copolymère AMVE

Dans 1 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO), sont dissoutes successivement 22 nmoles de copolymère AMVE
20 (masse molaire 67 000 g/mole) puis 16 µmoles du dérivé hydrazide issu de l'exemple 3. Après 20 minutes d'agitation du mélange réactionnel à température ambiante, 15 µl de la solution sont prélevés et ajoutés à 1 ml de solution d'anticorps à 0,5 g/l dans un tampon Tris-HCl 50
25 mM pH 9,2. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 heures. Les conjugués sont conservés en l'état à +4°C.

Le greffage de l'acide abiétique et de l'anticorps polyclonal sur le copolymère AMVE est contrôlé par un test
30 immunologique comme suit :

Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'acide abiétique obtenu selon l'exemple 10 est dilué à la concentration de 10 µg/ml dans un tampon carbonate 50 mM. Les puits d'une plaque de microtitration NUNC MAXISORB

sont sensibilisés avec cet anticorps pendant deux heures à 37°C. Après lavages au PBS (Phosphate Buffer Saline) - 0.5% Tween 20, des solutions de complexes AMVE/anticorps polyclonal de lapin anti-alpha foeto-protéine/dérivé hydrazide de l'acide abiétique dilués dans du PBS-Tween
5 contenant 10% en volume de sérum de cheval sont incubées une heure à 37°C. Deux possibilités de détection sont possibles à ce niveau de l'expérience :

- Détection de la fixation du dérivé hydrazide de
10 l'acide abiétique

Après trois lavages au PBS-Tween, on incube une heure à 37°C avec un anticorps monoclonal anti-acide abiétique conjugué à la Peroxydase dilué au 1/1500° dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval.
15 Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine, la réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les valeurs de Densité Optique
20 obtenues sont de 2500 milliAbsorbance pour les échantillons et de 170 pour le contrôle négatif, prouvant ainsi que le dérivé hydrazide de l'acide abiétique s'est bien fixé sur le polymère.

- Détection de la fixation de l'anticorps
25 polyclonal sur le copolymère AMVE.

Après trois lavages au PBS-Tween, on incube une heure à 37°C avec un anticorps anti-anticorps de chèvre conjugué à la Peroxydase dilué au 1/3000° dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après
30 lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine, la réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les valeurs de Densité Optique lues sont de 2500

milliAbsorbance pour les échantillons et de 25 pour le contrôle négatif, prouvant ainsi que l'anticorps polyclonal anti AFP s'est bien fixé sur le polymère.

Cet exemple montre que l'on peut détecter par une technique sandwich des polymères porteurs de l'acide abiétique.

Exemple 15 : Amplification du signal de détection de l'antigène alpha foeto-protéine par les complexes mixtes AMVE/dérivé hydrazide de l'acide abiétique / anticorps polyclonal anti-alpha foeto-protéine.

Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'alfa foeto-protéine (AFP) est dilué à la concentration de 10 µg/ml dans un tampon carbonate 50 mM. Les puits d'une plaque de microtitration NUNC MAXISORB sont sensibilisés pendant deux heures à 37°C avec cet anticorps. Après lavage au PBS - 0.5% Tween 20, des solutions d'antigène AFP dilué dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval sont incubées une heure à 37°C. A ce stade deux procédés de détection sont envisageables, soit d'une façon non amplifiée, soit en utilisant le complexe mixte précédemment obtenu pour accroître le niveau de signal.

- Détection simple de l'antigène AFP

Après trois lavages au PBS-Tween, on incube une heure à 37°C l'anticorps polyclonal anti-AFP conjugué à la Peroxydase dilué au 1/3000° dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine, la réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les valeurs de densité optique (DO), lues à 492 nm sur l'Axia micro-

reader de bioMérieux, pour les échantillons sont rapportées dans la figure annexée.

- Détection amplifiée par le polymère de l'antigène AFP

5 Après trois lavages au PBS-Tween, on fait incuber une heure à 37°C le conjugué mixte polymère / acide abiétique hydrazide / anticorps polyclonal anti-AFP dilué au 1/50° dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après lavages, on incube pendant une
10 heure à 37°C un anticorps anti-acide abiétique marqué à la peroxydase. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine. La réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la coloration est lue à 492 nm sur un
15 lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux. Les valeurs de DO, lues à 492 nm sur l'Axia micro-reader de bioMérieux, pour les échantillons sont rapportées dans la figure annexée.

Les résultats montrent que l'utilisation de polymère permet d'amplifier les signaux de détection lors
20 de l'utilisation d'une technique ELISA.

Exemple 16 : Essai en compétition avec des hormones naturelles

25 Un test ELISA en compétition a été effectué selon la technique décrite dans le brevet FR 93 07093 cité précédemment en utilisant les hormones naturelles T3, T4, progestérone, testostérone et oestradiol. Bien que les hormones stéroïdiennes présentent une analogie de
30 structure avec l'acide abiétique, il ne faut pas que les anticorps développés présentent des réactions croisées avec ces hormones.

La phase antigène a été obtenue comme décrit dans l'exemple 11, puis on incube une heure à 37°C des

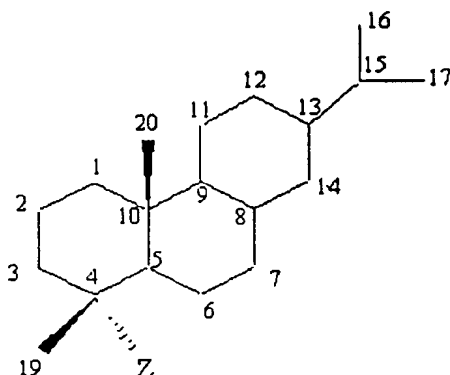
concentrations croissantes d'hormone dissoute dans une solution à 5 µg/ml d'un anticorps anti-acide abiétique dans du PBS-Tween contenant 10% en volume de sérum de cheval. Après lavages au PBS Tween, un anticorps anti-
5 anticorps de souris couplé à la peroxydase en solution dans du PBS Tween - cheval est incubé une heure à 37°C. Après lavages, on ajoute le substrat enzymatique, o-phénylène diamine La réaction colorimétrique est stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N. L'intensité de la
10 coloration est lue à 492 nm sur un lecteur Axia Micro-reader, bioMérieux.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'inhibition avec les hormones stéroïdiennes telles que œstradiol, testostérone et progestérone. Par contre on
15 observe une réaction croisée avec les hormones thyroïdiennes T3 et T4. On obtient 25% d'inhibition pour une concentration de 0,33 µmole/ml d'hormone ce qui est bien au delà des concentrations physiologiques en hormone totale (c'est à dire libre et liée) qui sont
20 respectivement de 2 - 4 nmole/l pour la T3 et 50 - 100 nmole/l pour la T4. Ces résultats permettent de conclure que les anticorps anti-acide abiétique sont très spécifiques et peuvent être utilisés dans le domaine de l'analyse sans risque de réaction croisée.

REVENDICATIONS

1. Dérivé saturé ou insaturé de l'abiétane de formule générale (I)

5



dans laquelle Z est choisi dans le groupe consistant en $-\text{COOR}^5$, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, $-\text{COONR}^3\text{R}^4$, $-\text{COR}^6$, $-\text{CON}$,
 10 $-\text{COOR}^5$, $-\text{CHOHR}^7$, $-\text{SR}^8$, $-\text{OR}^8$, $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, $-\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}^9$;

où R^1 , R^2 , R^3 et R^4 , indépendamment les uns des autres représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle de préférence comprenant de 6 à 20 atomes de carbone, éventuellement substitué ; un radical alcène comprenant de 7 à 10 atomes de carbone ; un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; un radical aminoacyle ou peptidyle éventuellement substitué, ou R^1 et
 20 R^2 ou R^3 et R^4 ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle ; R^5 représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un
 25 radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone ; R^6 représente un atome d'hydrogène,

un halogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, 5 comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R⁷ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; R⁸ représente un atome d'hydrogène, un 10 radical alkyle un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; et R⁹ est choisi parmi -CN, -CNO, -CNS, -NCO et -NCS;

15 à la condition que

(a) si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé saturé :

- Z ne représente pas l'un quelconque des radicaux suivants : -COOH, -NCO, -CONH₂, -CN, 20 N-benzylamide, N-isopropylamide, N-cyclohexylamide, N-cyclopentylamide, N-alpha-phényléthylamide, N,N-dibenzylamide, N-méthyl-N-cyclohexylamide, N-méthyl-N-phénylamide, 25 N-phényl-N-benzylamide, anilide, et -CONH[-(CH₂)_m-C₆H₅-X'_n] où m est égal à 0 ou 1, n est égal à 1, 2 ou 3, et X' représente un atome d'halogène, un groupe alkyle inférieur, un groupe haloalkyle, un groupe hydroxyle, un 30 groupe alcoxy inférieur, un groupe nitro, un groupe carbonyle, un groupe carboalcoxy et un groupe méthyle,

et

(b) si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé insaturé :

- Z ne représente pas l'un quelconque des radicaux suivants : -COOH, N-isopropylamide, N-méthyl-N-cyclohexylamide, N-cyclohexylamide, N-décylamide, N-dodécylamide, N-pentadécylamide, N-allylamide, N,N-diallylamide, N-cycloheptylamide, N-cyclopentylamide, N-benzylamide, N-alpha-phényléthylamide, N-alpha-phénylpropylamide, N,N-dibenzylamide, N-béta-phényléthylamide, N-éthyl-N-benzylamide, N-méthyl-N-phénylamide, anilide, et -CONH[-(CH₂)_m-C₆H₅-X'_n] où m est égal à 0 ou 1, n est égal à 1, 2 ou 3, et X' représente un atome d'halogène, un groupe alkyle inférieur, un groupe haloalkyle, un groupe hydroxyle, un groupe alcoxy inférieur, un groupe nitro, un groupe carbonyle, un groupe carboalcoxy et un groupe méthyle,
- Si Z représente -COOR⁵, R⁵ ne représente ni H, ni un radical méthyle, éthyle ou benzyle,
- Si Z représente -CONR¹R², et si l'un de R¹ et R² représente H, l'autre de R¹ et R² ne représente pas H, et si l'un de R¹ et R² représente le radical éthyle, l'autre de R¹ et R² ne représente pas le radical éthyle,
- Si Z représente -COR⁶ ou -CHOH R⁷, R⁶ et R⁷ ne représentent pas H.

2. Dérivé selon la revendication 1, dans lequel le radical alkyle comprend 6 atomes de carbone et le radical aryle comprend de 6 à 14 atomes de carbone.

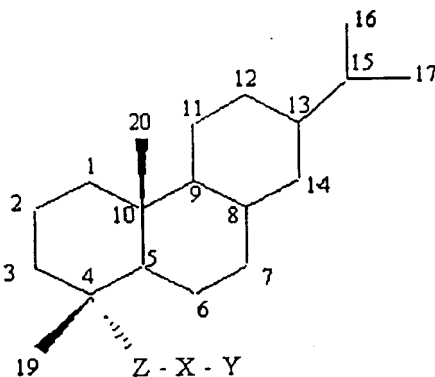
3. Dérivé selon les revendications 1 et 2, dans lequel -COONR³R⁴ représente un ester de N-hydroxysuccinimide, -COR⁶ représente un chlorure d'acide,

-CONR¹R² représente un groupement amide N-substitué dans lequel R¹ et R² indépendamment l'un de l'autre représente un atome d'hydrogène, un radical polyéthylèneglycol, un radical peptidyle éventuellement substitué comprenant de 2
5 à 6 résidus aminoacyles et -COOR⁵ est un ester de polyéthylèneglycol.

4. Dérivé selon la revendication 3, dans lequel R¹ et R² indépendamment l'un de l'autre représente un atome d'hydrogène, un radical tétraéthylèneglycol, un radical
10 hexaéthylèneglycol ou un radical glycyglycine et -COOR⁵ est choisi parmi les esters de tétraéthylèneglycol et d'hexaéthylèneglycol.

5. Dérivé selon la revendication 4, dans lequel le radical glycyglycine est substitué par la
15 N-hydroxysuccinimide.

6. Conjugué dérivé de l'abiétane selon la formule (II)



20

dans laquelle Z est choisi dans le groupe consistant en -COOR⁵, -CONR¹R², -COONR³R⁴, -COR⁶, -CON, -COOR⁵, -CHOHR⁷, -SR⁸, -OR⁸, -CN, -CNO, -CNS, -NCO, -NCS, -R¹R²CR⁹ ;

25

dans lesquels R¹, R², R³ et R⁴, indépendamment les uns des autres représentent un atome d'hydrogène, un

radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle comprenant de 6 à 20 atomes de carbone, éventuellement substitué ; un radical alcène comprenant de 7 à 10 atomes de carbone ; un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; un radical aminoacyle ou peptidyle éventuellement substitué, ou R¹ et R² ou R³ et R⁴ ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle ; R⁵ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne e comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R⁶ représente un atome d'hydrogène, un halogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R⁷ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; R⁸ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; et R⁹ est choisi parmi -CN, -CNO, -CNS, -NCO et -NCS ;

X est choisi parmi une chaîne aliphatique (CH₂)_n dans laquelle n est un nombre entier compris entre 0 et 10, un éthylène glycol ou un polyéthylèneglycol,, un résidu aminoacyle ou peptidyle;

Y représente un polymère choisi parmi les protéines, les polypeptides, les oligonucléotides ou polynucléotides et les polymères chimiques ;

à la condition que si ledit conjugué comprend un dérivé insaturé de l'abiétane Y ne soit pas la BSA.

7. Conjugué selon la revendication 6, dans lequel -COONR³R⁴ représente un ester de N-hydroxysuccinimide, 5 -COR⁶ représente un chlorure d'acide, -CONR¹R² représente un groupement amide N-substitué dans lequel R¹ et R² indépendamment l'un de l'autre représente un atome d'hydrogène ou un radical peptidyle éventuellement substitué comprenant de 2 à 6 résidus aminoacyles.

10 8. Conjugué selon la revendication 6, dans lequel le radical peptidyle est un radical glycyL-glycine et avantageusement le radical glycyL-glycine est substitué par la N-hydroxysuccinimide.

9. Conjugué selon l'une quelconque des 15 revendications 6, 7 ou 8, dans lequel X est choisi parmi (CH₂)₆, un éthylèneglycol, un polyéthylèneglycol, un radical peptidyle comprenant de 2 à 10 résidus aminoacyles et Y représente un polymère choisi parmi la BSA, les oligonucléotides de 18 à 22 mers, les homopolymères 20 d'anhydride maléique, les copolymères à base d'anhydride maléique, les copolymères à base de N-vinylpyrrolidone et les polysaccharides.

10. Conjugué selon la revendication 9, dans lequel le polymère est choisi parmi les oligonucléotides de 20 25 mers et avantageusement l'oligonucléotide SEQ ID NO 2, les poly (anhydride maléique-éthylène), les poly (anhydride maléique-propylène), les poly (anhydride maléique-méthylvinyléther) (AMVE) et le N-vinyl pyrrolidone-N-acryloxysuccinimide (NVP-NAS).

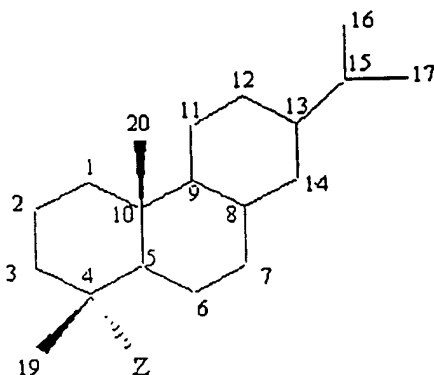
30 11. Conjugué selon la revendication 10, dans lequel le polymère est couplé à au moins une protéine et/ou un polypeptide et/ou un oligonucléotide.

12. Procédé pour l'obtention d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux, selon lequel on immunise un

organisme approprié, selon des techniques connues, avec un conjugué tel que défini dans les revendications 6 à 11.

13. Réactif, comprenant en outre un dérivé saturé ou insaturé de l'abiétane répondant à la formule (I)

5



dans laquelle Z est choisi dans le groupe consistant en $-\text{COOR}^5$, $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, $-\text{COONR}^3\text{R}^4$, $-\text{COR}^6$, $-\text{CON}$, $-\text{COOR}^5$, $-\text{CHOHR}^7$, $-\text{SR}^8$, $-\text{OR}^8$, $-\text{CN}$, $-\text{CNO}$, $-\text{CNS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, $-\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}^9$;

où R^1 , R^2 , R^3 et R^4 , indépendamment les uns des autres représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle de préférence comprenant de 6 à 20 atomes de carbone, éventuellement substitué ; un radical alcène comprenant de 7 à 10 atomes de carbone ; un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; un radical aminoacyle ou peptidyle éventuellement substitué, ou R^1 et R^2 ou R^3 et R^4 ensemble peuvent former un cycle ou un hétérocycle ; R^5 représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, comprenant de 6 à 20 atomes de carbone ; R^6 représente un atome d'hydrogène,

un halogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical aryle, éventuellement substitué, 5 comprenant de 6 à 20 atomes de carbone; R⁷ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; R⁸ représente un atome d'hydrogène, un 10 radical alkyle un radical alkyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcène comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, un radical alcyne comprenant de 1 à 10 atomes de carbone; et R⁹ est choisi parmi -CN, -CNO, -CNS, -NCO et -NCS ;

15 à la condition que si ledit dérivé de l'abiétane est un dérivé insaturé, Z ne représente pas un radical acide carboxylique,

ledit dérivé étant couplé à une protéine choisie parmi les polypeptides, les antigènes et les anticorps.

20 14. Réactif, comprenant en outre un anticorps monoclonal ou polyclonal obtenu selon le procédé de la revendication 12, ledit anticorps étant immobilisé sur un support solide et/ou marqué par tout marqueur approprié.

15. Utilisation d'un réactif tel que défini selon 25 les revendications 13 et/ou 14 dans un test de diagnostic.

16. Composition diagnostique comprenant en outre un réactif tel que défini selon les revendications 13 et/ou 14.

17. Réactif, comprenant en outre un conjugué tel 30 que défini selon les revendications 6 à 11.

18. Utilisation d'un réactif tel que défini selon les revendications 14 et/ou 17 dans un test de diagnostic.

19. Composition diagnostique comprenant en outre un réactif tel que défini selon les revendications 14 et/ou 17.

20. Dispositif comprenant outre un support solide
5 un anticorps monoclonal ou polyclonal obtenu selon le procédé de la revendication 12 immobilisé directement ou indirectement sur ledit support solide.

21. Composition pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques comprenant en outre un conjugué tel que
10 défini dans les revendications 6 à 11 et un anticorps obtenu selon le procédé de la revendication 12.

22. Composition selon la revendication 21, dans laquelle ledit conjugué comprend un polymère tel que défini dans l'une des revendication 10 et 11.

15 23. Utilisation d'une composition selon les revendications 21 et 22 dans un test pour le dosage et/ou le suivi de produits chimiques.

1/1

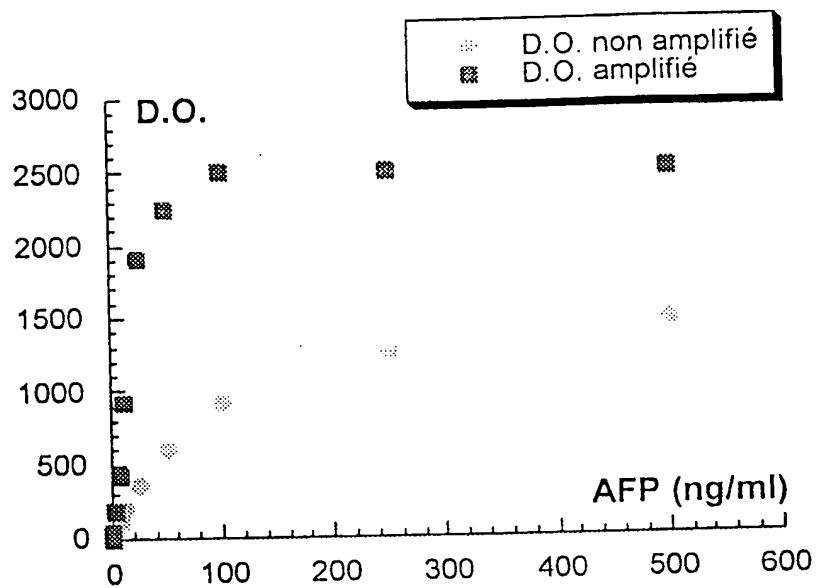


Fig 1

LISTE DE SEQUENCES¹

<110> BIO MERIEUX

<120> DERIVES SATURES ET INSATURES DE L'ABIETANE, CONJUGUES
DERIVES ET UTILISATIONS DANS UNE COMPOSITION
DIAGNOSTIQUE, UN REACTIF ET UN DISPOSITIF

<130> Abiétane

<140>

<141>

<150> FR9810084

<151> 1998-07-31

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide de synthèse

<400> 1

actaaaaact agtaatgcaa ag

22

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide de synthèse

<400> 2

atgtcacgag caattaagcg

20

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

2

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide de synthèse

<400> 3

actaaaaact agnaatgcaa ag

22

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide de synthèse

<400> 4

accccgagat ttacgttatg t

21

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide de synthèse

<400> 5

tttttttttt tttttttttt

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/01846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C243/36 C07D207/46 C07K5/06 C12Q1/68 G01N33/53
G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C C07D C07K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEREK H. R. BARTON ET L.: "New and Improved Methods for the Radical Decarboxylation of Acids" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS., no. 17, 1983, pages 939-941, XP002100080 LETCHEWORTH GB page 939; example 24; table 1 page 940; example 24; table 2 --- -/--	1-4



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 1999

Date of mailing of the international search report

08/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zervas, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01846

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 69, no. 9, 26 August 1968 (1968-08-26) Columbus, Ohio, US; abstract no. 36282g, I. I. BARDYSHEV ET AL.: "Preparation and study of abietic acid anhydride" page 3396; column 2; XP002100082 abstract & DOKL, AKAD. NAUK BELORUSS. SSR, vol. 12, no. 4, 1968, pages 344-347, ----	1,2
A	US 5 395 938 A (K. RAMAKRISHNAN) 7 March 1995 (1995-03-07) the whole document ----	1-23
A	US 5 132 242 A (SAU W. CHEUNG) 21 July 1992 (1992-07-21) the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01846

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5395938 A	07-03-1995	AU 677017 B	10-04-1997
		AU 5086493 A	15-03-1994
		EP 0656005 A	07-06-1995
		FI 950764 A	20-04-1995
		JP 8504751 T	21-05-1996
		NO 950632 A	07-04-1995
		NZ 255853 A	26-05-1997
		WO 9404538 A	03-03-1994
US 5132242 A	21-07-1992	US 5194300 A	16-03-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 99/01846

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07C243/36 C07D207/46 C07K5/06 C12Q1/68 G01N33/53
G01N33/58

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07C C07D C07K C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DEREK H. R. BARTON ET L.: "New and Improved Methods for the Radical Decarboxylation of Acids" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS., no. 17, 1983; pages 939-941, XP002100080 LETCHEWORTH GB page 939; exemple 24; tableau 1 page 940; exemple 24; tableau 2 --- -/--	1-4

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 octobre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/11/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Zervas, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den 3 Internationale No

PCT/FR 99/01846

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 69, no. 9, 26 août 1968 (1968-08-26) Columbus, Ohio, US; abstract no. 36282g, I. I. BARDYSHEV ET AL.: "Preparation and study of abietic acid anhydride" page 3396; colonne 2; XP002100082 abrégé & DOKL. AKAD. NAUK BELORUSS. SSR, vol. 12, no. 4, 1968, pages 344-347, ----	1,2
A	US 5 395 938 A (K. RAMAKRISHNAN) 7 mars 1995 (1995-03-07) le document en entier ----	1-23
A	US 5 132 242 A (SAU W. CHEUNG) 21 juillet 1992 (1992-07-21) le document en entier -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem : Internationale No
PCT/FR 99/01846

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5395938 A	07-03-1995	AU 677017 B	10-04-1997
		AU 5086493 A	15-03-1994
		EP 0656005 A	07-06-1995
		FI 950764 A	20-04-1995
		JP 8504751 T	21-05-1996
		NO 950632 A	07-04-1995
		NZ 255853 A	26-05-1997
		WO 9404538 A	03-03-1994
US 5132242 A	21-07-1992	US 5194300 A	16-03-1993

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.